

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類6 A61K 38/17, A61P 3/00, 43/00, C07K 14/47	A1	(11) 国際公開番号 WO00/21554 (43) 国際公開日 2000年4月20日 (20.04.00)
(21) 国際出願番号 PCT/JP99/05570 (22) 国際出願日 1999年10月8日 (08.10.99) (30) 優先権データ 特願平10/287738 1998年10月9日 (09.10.98) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 三共株式会社(SANKYO COMPANY, LIMITED)[JP/JP] 〒103-8426 東京都中央区日本橋本町3丁目5番1号 Tokyo, (JP) 雪印乳業株式会社 (SNOW BRAND MILK PRODUCTS CO., LTD.)(JP/JP) 〒160-8575 東京都新宿区本塩町13番地 Tokyo, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 大泉喜代志(OIZUMI, Kiyoshi)[JP/JP] 蔵方慎一(KURAKATA, Shinichi)[JP/JP] 〒140-8710 東京都品川区広町1丁目2番58号 三共株式会社内 Tokyo, (JP) (74) 代理人 中村 稔, 外(NAKAMURA, Minoru et al.) 〒100-8355 東京都千代田区丸の内3丁目3番1号 新東京ビル646号 Tokyo, (JP)		(81) 指定国 AU, BR, CA, CN, CZ, HU, ID, IL, IN, KR, MX, NO, NZ, PL, RU, TR, US, ZA, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE) 添付公開書類 国際調査報告書
(54) Title: PREVENTIVES OR REMEDIES FOR CACHEXIA (54) 発明の名称 悪液質予防剤又は治療剤 (57) Abstract Preventives or remedies for cachexia which contain as the active ingredient osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) or its variant.		

(57)要約

本発明は、破骨細胞形成抑制因子 (Osteoclastogenesis Inhibitory Factor: OCIF) 又はその変異体を有効成分とする悪液質の予防、又は治療薬を提供するものである。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AL	アルバニア	EE	エストニア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AU	オーストラリア	FR	フランス	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LS	レソト	SK	スロヴァキア
HA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BE	ベルギー	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MA	モロッコ	TD	チャード
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MC	モナコ	TG	トーゴ
BJ	ベナン	GN	ギニア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BR	ブラジル	GW	ギニア・ビサウ	MG	マダガスカル	TZ	タンザニア
BY	ベラルーシ	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア 共和国	TM	トルクメニスタン
CA	カナダ	HR	クロアチア	ML	マリ	TR	トルコ
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	TT	トリニダード・トバゴ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MR	モーリタニア	UA	ウクライナ
CH	スイス	IE	アイルランド	MW	マラウイ	UG	ウガンダ
CI	コートジボアール	IL	イスラエル	MX	メキシコ	US	米国
CM	カメルーン	IN	インド	NE	ニジェール	UZ	ウズベキスタン
CN	中国	IS	アイスランド	NL	オランダ	VN	ヴェトナム
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NO	ノルウェー	YU	ユーゴスラビア
CU	キューバ	JP	日本	NZ	ニュージーランド	ZA	南アフリカ共和国
CY	キプロス	KE	ケニア	PL	ポーランド	ZW	ジンバブエ
CZ	チェッコ	KG	キルギスタン	PT	ポルトガル		
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	RO	ルーマニア		
DK	デンマーク	KR	韓国				

明細書

悪液質予防剤又は治療剤

技術分野

本発明は、破骨細胞形成抑制因子(Osteoclastogenesis Inhibitory Factor:以下、「OCIF」という。)を有効成分とする悪液質予防剤、又は治療剤に関する。

背景技術

悪液質は、悪性腫瘍、結核、糖尿病、血液疾患、内分泌疾患、感染症及び後天性免疫不全症候群等の慢性病において発症する、進行性の体重減少、貧血、浮腫、食欲不振などを主症状とする全身性の疾患である(J. Parenteral and Enteral Nutrition, vol.12, 286-298, (1988); American Journal of Medicine, vol.85, 289-291, (1988)参照)。

特に悪性腫瘍の患者が悪液質を発症した場合において、抗腫瘍剤を投与し続け抗腫瘍効果が現れたとしても、むしろ抗腫瘍剤による骨髄毒性などの副作用が加わり、通常は悪液質の改善は認められない(J. Clinical Oncology, vol.12, 213-225, (1994)参照)。

また、特に悪性腫瘍患者において悪液質が進行すると、その患者の体力が著しく減退するため、一般的に毒性が強いとされている抗腫瘍剤による治療を続行することができなくなり、悪性腫瘍の治療に支障をきたすこととなる(J. Clinical Oncology, vol.12, 213-225, (1994)参照)。

さらに、悪液質の症状を改善するために栄養補給を行うことが多いが、このような処置によりかえって悪性腫瘍の増大をもたらし、患者の生存期間を短縮する場合があった(J. Clinical Oncology, vol.12, 213-225, (1994)参照)。

以上より、悪液質の症状を改善する薬剤の開発が望まれている。

一方、OCIFは配列番号1のアミノ酸番号1乃至380に記載されるアミノ酸配列から成り、破骨細胞の分化/又は成熟を抑制する活性を有する蛋白質として見出されており、骨粗鬆症等の骨量減少症や、変形性関節症又は多発性骨髄腫等の

骨代謝異常症の予防又は治療薬として有用であることが知られている (WO96/26217 号)。しかしながら、該蛋白質が悪液質の予防、治療効果を有することは知られていない。

発明の開示

本発明者らは、OCIF 又はその変異体が悪液質に対し優れた予防又は治療効果を有することを見出し、本発明を完成した。

本発明は、

(1) 配列表の配列番号 1 のアミノ酸番号 1 乃至 380 に示されるアミノ酸配列を含むことから成る破骨細胞形成抑制因子 (OCIF) 又はその変異体を有効成分とする悪液質の予防剤又は治療剤、

(2) 配列表の配列番号 1 のアミノ酸番号 1 乃至 380 に示されるアミノ酸配列を含むことから成る破骨細胞形成抑制因子 (OCIF) を有効成分とする悪液質の予防剤又は治療剤、

に関する。

本発明において、「変異体」とは、OCIF の有するアミノ酸配列のうち一つ又は複数のアミノ酸が置換、欠失、付加又は挿入された蛋白質で OCIF 活性 (破骨細胞形成抑制活性) を有する蛋白質をいう。

OCIF 蛋白質自体は、WO96/26217 号に記載された方法により製造することができる。

一般に真核生物の遺伝子は、インターフェロン遺伝子などで知られているように多型現象 (polymorphism) を示すと考えられ (例えば、Nishi, T. et al. (1985) J. Biochem. 97, 153-159 を参照)、この多型現象によって、1 個又は複数のアミノ酸が置換される場合もあれば、ヌクレオチド配列の置換はあってもアミノ酸は全く変わらない場合もある。

配列番号 1 のアミノ酸番号 1 乃至 380 に示されるアミノ酸配列から成る OCIF 蛋白質のアミノ酸配列の中の一つ又は複数の部位において、一つ若しくは複数のアミノ酸残基が置換、欠失、付加又は挿入されている蛋白質でも OCIF 活性を有することが多い。本発明においてはこれらの蛋白質を OCIF の変異体と呼ぶ。

すなわち、それら天然に存在するか、あるいは人工合成された蛋白質が、OCIF 活性を有する限り、それらの蛋白質はすべて本発明において使用され得る。

このような蛋白質をコードする DNA は、上記の OCIF 活性を有する蛋白質の情報に基づいて、例えばホスファイト・トリエステル法 (Nature, 310, 105-111, (1984)参照) などの常法に従い、核酸の化学合成により製造することができる。

なお、所望アミノ酸に対するコドンは、その選択も任意でよく、例えば利用する宿主のコドン使用頻度を考慮して常法に従い決定できる (Nucleic Acid Res. 9, 143-174, (1981)参照)。さらにこれらヌクレオチド配列のコドンの一部改変は、常法に従い、所望の改変をコードする合成ヌクレオチドからなるプライマーを利用した、部位特異的変異導入法 (site specific mutagenesis/ Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 5662-5666, (1984)参照) などにより行うことができる。また、任意の一本若しくは複数のアミノ酸残基を欠失させた変異体を作成するためには、エキソヌクレアーゼ Ba131 等を用いて DNA を末端から削る方法 (「続生化学実験講座 1・遺伝子研究法 II」335-354 頁参照)、カセット変異法 (「新生化学実験講座 2・核酸 III 組換え DNA 技術」242-251 頁参照) などに従うことができる。

なお、所望のアミノ酸に対するコドンはそれ自体公知であり、その選択も任意でよく、例えば利用する宿主のコドン使用頻度を考慮して常法に従い決定できる。

OCIF 活性の測定は WO96/26217 号に記載された方法により行うことができる。

本発明において、「悪液質」とは、悪性腫瘍、結核、糖尿病、血液疾患、内分泌疾患、感染症及び後天性免疫不全症候群等の慢性病において発症する、進行性の体重減少、貧血、浮腫、食欲不振などを主症状とする全身性の疾患をいう。

発明を実施するための最良の形態

以下、実施例及び製剤例により本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されない。

実施例 1. OCIF の抗悪液質効果

1 群 10 匹の Balb/c マウス（雌性、7 週齢）の皮下に、約 2 mm 角のマウス結腸癌 Colon26 細胞を移植した。

WO 96/26217 号記載の方法により製造した OCIF（配列番号 1 のアミノ酸番号 1 乃至 380 で示される蛋白質）3 mg/kg、10 mg/kg 体重を、1 日 2 回、腫瘍細胞移植 7 日後より連日静脈内投与した。OCIF は、0.01% Tween80 含有 PBS（Phosphate Buffered Saline : 10mM りん酸ナトリウム、0.15M 塩化ナトリウム、(pH7.0)）に溶解したものを使用した。

抗悪液質効果は、以下の式により算定される体重回復率を指標とした。

体重変化 (Δ) = 癌移植後 12 日目の体重 (g) - 癌移植後 7 日目の体重、
として

OCIF 投与担癌マウスの体重変化 = (Δ_A)、

OCIF 非投与担癌マウスの体重変化 = (Δ_B) *、

OCIF 非投与正常マウスの体重変化 = (Δ_C) *、

とした場合、

$$\text{体重回復率 (\%)} = (\Delta_A - \Delta_B) / (\Delta_C - \Delta_B) \times 100$$

* OCIF 非投与マウスには上記 0.01% Tween80 含有 PBS のみを投与した。

OCIF を 3mg/kg 投与した担癌マウスは 31% の体重回復率、10 mg/kg 投与した担癌マウスは 50% の体重回復率を示した。

実施例 2. OCIF の延命活性

実施例 1 記載の方法に従い、1 群 10 匹の Balb/c マウス（雌性、7 週齢）の皮下に、約 2 mm 角のマウス結腸癌 Colon26 細胞を移植した。

実施例 1 と同様の方法で製造した OCIF（配列番号 1）30mg/kg 体重を、1 日 2 回、腫瘍細胞移植 7 日後より連日腹腔内投与した。

延命活性は、次式に従い、延命率（％）により評価した。

$$\text{延命率（％）} = (A/B - 1) \times 100$$

A：OCIF 投与担癌マウス群生存日数の中央値

B：OCIF 非投与担癌マウス群生存日数の中央値*

* OCIF 非投与マウスには上記 0.01% Tween80 含有 PBS のみを投与した。

OCIF を投与したマウスは 100% の延命率を示した。

製剤例 1.

本発明の OCIF 又はその変異体を有効成分とする懸液質予防剤、又は治療剤は、水又はそれ以外の薬理学的に許容し得る溶液に溶解した無菌性溶液又は懸濁液のアンプルとして使用に供され、また無菌粉末製剤（OCIF 又はその変異体の溶液を凍結乾燥するのが望ましい。）をアンプルに充填しておき、同時に薬理学的に許容し得る溶液に希釈してもよい。

産業上の利用の可能性

本発明の懸液質の予防剤又は治療剤は、OCIF 又はその変異体を有効成分とするものであるが、種々の形態で投与することができる。それらの投与形態としては、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、シロップ剤による経口投与、又は、注射剤、点滴剤、座薬などによる非経口投与を挙げることができる。

その投与量は、症状、年齢、体重などによって異なるが、通常、経口投与では、成人に対して、一日約 0.1mg ないし 1000mg であり、これらを 1 回、または数回に分けて投与することができる。また、非経口投与では 1 回 0.1mg ないし 1000mg を皮下注射、筋肉注射または静脈注射によって投与することができる。

（本頁以下余白）

請求の範囲

1. 配列表の配列番号1のアミノ酸番号1乃至380に示されるアミノ酸配列を含むことから成る破骨細胞形成抑制因子又はその変異体を有効成分とする悪液質の予防剤又は治療剤。

2. 配列表の配列番号1のアミノ酸番号1乃至380に示されるアミノ酸配列を含むことから成る破骨細胞形成抑制因子を有効成分とする悪液質の予防剤又は治療剤。

SEQUENCE LISTING

<110> Sankyo Company Limited
Snow Brand Milk Products Co., Ltd.

<120> Agent for treating or preventing Cachexia

<130> FP-9917

<140>

<141>

<150> JP HE110-287738

<151> 1998-10-09

<160> 1

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 401

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> mat peptide

<222> (1).. (380)

<400> 1

Met Asn Asn Leu Leu Cys Cys Ala Leu Val Phe Leu Asp Ile Ser Ile
-20 -15 -10

Lys Trp Thr Thr Gln Glu Thr Phe Pro Pro Lys Tyr Leu His Tyr Asp
-5 -1 1 5 10

Glu Glu Thr Ser His Gln Leu Leu Cys Asp Lys Cys Pro Pro Gly Thr
15 20 25

Tyr Leu Lys Gln His Cys Thr Ala Lys Trp Lys Thr Val Cys Ala Pro
30 35 40

Cys Pro Asp His Tyr Tyr Thr Asp Ser Trp His Thr Ser Asp Glu Cys
45 50 55

Leu Tyr Cys Ser Pro Val Cys Lys Glu Leu Gln Tyr Val Lys Gln Glu
60 65 70 75

Cys Asn Arg Thr His Asn Arg Val Cys Glu Cys Lys Glu Gly Arg Tyr
80 85 90

Leu Glu Ile Glu Phe Cys Leu Lys His Arg Ser Cys Pro Pro Gly Phe
95 100 105

Gly Val Val Gln Ala Gly Thr Pro Glu Arg Asn Thr Val Cys Lys Arg
110 115 120

Cys Pro Asp Gly Phe Phe Ser Asn Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro Cys
125 130 135

Arg Lys His Thr Asn Cys Ser Val Phe Gly Leu Leu Leu Thr Gln Lys
140 145 150 155

Gly Asn Ala Thr His Asp Asn Ile Cys Ser Gly Asn Ser Glu Ser Thr
160 165 170

Gln Lys Cys Gly Ile Asp Val Thr Leu Cys Glu Glu Ala Phe Phe Arg
175 180 185

Phe Ala Val Pro Thr Lys Phe Thr Pro Asn Trp Leu Ser Val Leu Val

190	195	200
Asp Asn Leu Pro Gly Thr Lys Val Asn Ala Glu Ser Val Glu Arg Ile 205 210 215		
Lys Arg Gln His Ser Ser Gln Glu Gln Thr Phe Gln Leu Leu Lys Leu 220 225 230 235		
Trp Lys His Gln Asn Lys Asp Gln Asp Ile Val Lys Lys Ile Ile Gln 240 245 250		
Asp Ile Asp Leu Cys Glu Asn Ser Val Gln Arg His Ile Gly His Ala 255 260 265		
Asn Leu Thr Phe Glu Gln Leu Arg Ser Leu Met Glu Ser Leu Pro Gly 270 275 280		
Lys Lys Val Gly Ala Glu Asp Ile Glu Lys Thr Ile Lys Ala Cys Lys 285 290 295		
Pro Ser Asp Gln Ile Leu Lys Leu Leu Ser Leu Trp Arg Ile Lys Asn 300 305 310 315		
Gly Asp Gln Asp Thr Leu Lys Gly Leu Met His Ala Leu Lys His Ser 320 325 330		
Lys Thr Tyr His Phe Pro Lys Thr Val Thr Gln Ser Leu Lys Lys Thr 335 340 345		
Ile Arg Phe Leu His Ser Phe Thr Met Tyr Lys Leu Tyr Gln Lys Leu 350 355 360		
Phe Leu Glu Met Ile Gly Asn Gln Val Gln Ser Val Lys Ile Ser Cys 365 370 375		
Leu 380		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/05570

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁶ A61K38/17, A61P3/00, A61P43/00, C07K14/47

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁶ A61K38/17, A61P3/00, A61P43/00, C07K14/47

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAPLUS (STN), MEDLINE (STN), Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq,
SwissProt/PIR/Geneseq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO, 98/12344, A1 (HUMAN GENOME SCIENCES), 26 March, 1998 (26.03.98), Fig.2; page 9, lines 14-18; page 68, lines 15-17; page 63, lines 13-20 & AU, 9673646, A	1, 2
Y	EP, 816380, A1 (SNOW BRAND MILK PRODUCTS CO., LTD.), 07 January, 1998 (07.01.98), Examples 13 to 23 & WO, 96/26217, A1	1, 2
Y	YASUDA, N., et al. "Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis", Endocrinology, (March 1998), Vol. 139, No. 3, p.1329-1337,	1, 2

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
 "A" document defining the general state of the art which is not
 considered to be of particular relevance
 "E" earlier document but published on or after the international filing
 date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is
 cited to establish the publication date of another citation or other
 special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other
 means
 "P" document published prior to the international filing date but later
 than the priority date claimed

"I" later document published after the international filing date or
 priority date and not in conflict with the application but cited to
 understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
 considered novel or cannot be considered to involve an inventive
 step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
 considered to involve an inventive step when the document is
 combined with one or more other such documents, such
 combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
17 December, 1999 (17.12.99)Date of mailing of the international search report
28 December, 1999 (28.12.99)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. cl⁷ A61K38/17, A61P3/00, A61P43/00, C07K14/47

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. cl⁷ A61K38/17, A61P3/00, A61P43/00, C07K14/47

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN), MEDLINE (STN), Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq.
SwissProt/PIR/Geneseq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO, 98/12344, A1 (HUMAN GENOME SCIENCES), 26. 3月. 1998 (26. 03. 98), Fig. 2, 第9頁第14-18行, 第68頁15-17行及び 第63頁第13-20行参照 & AU, 9673646, A	1, 2
Y	EP, 816380, A1 (SNOW BRAND MILK PRODUCTS CO., LTD.), 7. 1月. 1998 (07. 01. 98), 実施例13-23参照 & WO, 96/26217, A1	1, 2

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリ

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

17. 12. 99

国際調査報告の発送日

28.12.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

大宅 郁治



4C

9639

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	YASUDA, N., et al 'Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis', Endocrinology, (March 1998), Vol.139, No.3, p.1329-1337, Discussion 参照	1, 2